MEDIZINISCHE KLINIK UND POLIKLINIK E
DER UNIVERSITÄT DÜSSELDORF
Direktor: Prof. Dr. H. Zimmermann

PHARMAKOKINETIK SUBKUTAN INJIZIERTER ALT- UND VERZÖGERUNGSINSULINE

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Heidi Hegner

1982

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41538101_0056

MEDIZINISCHE KLINIK UND POLIKLINIK E DER
UNIVERSITÄT DÜSSELDORF

Direktor: Prof. Dr. H. Zimmermann

PHARMAKOKINETIK SUBKUTAN INJIZIERTER ALT- UND VERZÖGERUNGSINSULINE

D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf
vorgelegt von

Heidi Hegner

1982

"Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf"

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

gez.: Prof. Dr. Arnold

Referent
gez.: Prof. Dr. Berger

Korreferent
gez.: Priv.-Doz.
Dr. Wendel

Inhaltsverzeichnis

Seite

A E I N L E I T U N G 3

B M A T E R I A L U N D M E T H O D E N

I Versuchspersonen und -ablauf 5
II Materialien 6
III Blutproben 7
IV Spezieller Versuchsablauf 7
V Statistische Methoden 10

C E R G E B N I S S E

I Absorptionskinetik von Altinsulin

1. Kontrollen 12
2. Effekte von Trasylol^{R} u. Benzyl-Alkohol 12
3. Effekte von Eigenserum 15
4. Effekte von Protamin 15

II Absorptionskinetik von Verzögerungsinsulinen

1. Kontrollen 17
2. Veränderungen durch lokale Wärmeanwendung 20
3. Veränderungen durch Muskelarbeit 20
4. Veränderungen durch lokale Massage 21

D T A B E L L E N 26

E D I S K U S S I O N 34

F Z U S A M M E N F A S S U N G 47

G L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S 49

H D A N K S A G U N G 56

Anlage 1: Lebenslauf 57
Anlage 2: Erklärungen 58

A EINLEITUNG

Bis vor 60 Jahren gehörten neben Diät und Fastentagen sowohl Bettruhe (1) als auch Bewegung (2, 3) zu den völlig unzureichenden Behandlungsmethoden des Diabetes mellitus. Erst mit der Entdeckung des Insulins durch Banting und Best und seiner ersten klinischen Verwendung (4) trat eine entscheidende Wende in der Therapie ein und die Möglichkeit der exogenen Insulinzufuhr wurde für viele juvenile Diabetiker lebensrettend. Dabei ist bis heute die subkutane Insulininjektion die Applikationsart der Wahl, da sie vom Patienten selbst durchgeführt werden kann. Trotz jahrzehntelanger Anwendung dieser Therapie bei Millionen von Diabetikern ist der Frage nach den molekularen Mechanismen und dem zeitlichen Ablauf der Insulinabsorption aus dem subkutanen Depot wenig Aufmerksamkeit geschenkt worden. So gibt es nur wenige aussagekräftige Arbeiten zu diesem Thema (5, 6, 7). Die Absorptionskinetik des applizierten Insulins ist aber von entscheidendem Einfluß auf die gute Einstellung des diabetischen Patienten. Dies ist um so bedeutender, als nach neuesten Studien ein Kausalzusammenhang zwischen ungenügend korrigierter Stoffwechsellage und den vaskulären Spätkomplikationen des Diabetikers als erwiesen gilt (8, 9).

Die vorliegende Studie dient der näheren Charakterisierung der Absorption subkutan injizierter Insuline unter systematisch nach Gesichtspunkten klinisch-therapeutischer Relevanz variierten Bedingungen. Da heute die meisten Patienten mit längerwirkenden Insulinen behandelt werden, fanden neben Altinsulinen insbesondere Verzögerungsinsuline Berücksichtigung. Untersucht wurden einerseits die Effekte chemisch-pharmakologischer Einflüsse, wie Zugabe des Proteasen-

inhibitors Aprotinin, Zugabe von Eigenserum oder Zugabe von Protaminlösung zur Injektion, auf die Absorption subkutan injizierten Altinsulins und andererseits die Effekte physikalischer Einflüsse, wie lokaler Wärmeanwendung, Muskelarbeit oder Massage der Injektionsstelle, auf die Absorptionskinetik subkutan applizierter Verzögerungsinsuline.

B MATERIAL UND METHODEN

I Versuchspersonen und -ablauf

Für die in Übereinstimmung mit der Helsinki Deklaration von 1975 durchgeführten Versuche wurden nichtdiabetische, normalgewichtige Freiwillige im Alter von 25 ± 4 Jahren ausgewählt. Zur Vermeidung möglicher geschlechtsabhängiger Differenzen durch die unterschiedliche Gewebsverteilung mit höherem Fettgewebsanteil des weiblichen Organismus wurden ausschließlich Männer zugelassen. Sie hatten nie zuvor Insulininjektionen erhalten und waren zur Zeit der Versuche frei von akuten oder chronischen Erkrankungen. Die Versuche begannen morgens um 8^{00} Uhr nach zehnstündiger Nahrungskarenz. In ihrem Verlauf befanden sich die Probanden ruhend in liegender Position und sie durften weder Nahrung noch Getränke oder Nikotin zu sich nehmen. Zunächst wurde mit Hilfe eines Teflonkatheters und 0,9%iger NaCl-Infusion ein venöser Zugang zu einer Ellenbeugenvene gelegt. Aus der so offen gehaltenen Vene konnte dann mehrfach, in bestimmten Abständen Blut entnommen werden. Dabei wurden die ersten, durch die Kochsalzinfusion verdünnten 2-3ml Venenblut verworfen.
Zehn Minuten nach Anlegen der Infusion, zum Zeitpunkt 0′ erfolgte mit einer 1-ml-Plastipak Spritze (Becton & Dickinson, Heidelberg) die subkutane Injektion von 10 I.E. eines Alt- oder 20 I.E. eines Verzögerungsinsulins in die Vorderseite des Oberschenkels. Alle Injektionen wurden mit gleicher Einstichtiefe, gleichem Einstichwinkel und gleicher Injektionsgeschwindigkeit von derselben Person durchgeführt. Die Nadel blieb vor dem Herausziehen 10 bis 15 Sekunden im Gewebe liegen, um ein Zurückfließen der applizierten Lösung zu verhindern.

Der Gefahr der Hypoglykämie sollte durch sofortige Blutglukose-Bestimmung mit dem Beckman-Analyzer und wenn nötig intravenöser Infusion von Glukose-Lösung begegnet werden. Es trat jedoch keine klinisch relevante Hypoglykämie auf, so daß alle Versuche bis zum Ende durchgeführt werden konnten. Nach Beendigung des jeweiligen Versuchs wurden die Probanden mit einem Glukosetrank und der Aufforderung, reichlich Kohlehydrate zu sich zu nehmen, entlassen.

II Materialien

Zur exogenen Applikation wurden folgende Insulin-Präparate benutzt: Actrapid^{R} Insulin (Novo Industrie GmbH, Mainz), Monotard^{R} Insulin (Novo Industrie GmbH, Mainz), Leo-NPH^{R} Insulin (Nordisk-Hormon-Chemie, München) und Leo-Regular^{R} Insulin (Nordisk-Hormon-Chemie, München).
Zur Abklärung der Effekte chemisch-pharmakologischer Einflüsse auf die Insulinabsorption fanden folgende Substanzen Verwendung: der Proteaseninhibitor Aprotinin als Trasylol^{R} (Bayer-AG, Leverkusen) in einer Konzentration von 20 000 Kallikrein-Inhibitor-Einheiten pro ml; das Lösungsmittel von Trasylol^{R}, eine Benzyl-Alkohol-Lösung, die von der Bayer-AG, Leverkusen zur Verfügung gestellt wurde, Protaminlösung, daß heißt 130nl Protamin "1000" Roche ad 0,5ml mit 0,9%iger NaCl-Lösung aufgefüllt und Eigenserum des entsprechenden Probanden. Letzteres wurde jeweils eine halbe Stunde vor Versuchsbeginn steril durch Blutentnahme, Zentrifugation und Dekantation gewonnen. Alle Substanzen wurden unmittelbar vor der Applikation mit dem zu injizierenden Insulin gemischt.

III Blutproben

Jede entnommene Blutprobe ergab drei unterschiedlich zu behandelnde Portionen:
Eine davon wurde zur Enteiweißung zu 10%iger Perchlorsäure gegeben, gemischt, eisgekühlt, später zentrifugiert, neutralisiert und dekantiert. Der so gewonnene Überstand diente der Bestimmung von Lactat, Pyruvat, Acetoacetat und ß-Hydroxy-Butyrat. Aus einer weiteren Portion wurde durch Zugabe zu Na-EDTA und Aprotinin und anschließender Zentrifugation Plasma gewonnen und zur späteren Glukagonbestimmung eingefroren. Die letzte Portion wurde direkt zentrifugiert und das erhaltene Serum diente der Konzentrationsbestimmung von Glukose, freien Fettsäuren, Insulin und C-Peptid[1]. Die Messung der Glukose erfolgte enzymatisch mit dem Beckman-Analyzer, die der freien Fettsäuren kolorimetrisch nach Stainer und Sura (10) und die des Insulins und des C-Peptids radioimmunologisch. Alle übrigen Parameter wurden nach früher beschriebenen Methoden bestimmt (11, 12).

IV Spezieller Versuchsablauf

Die erste Versuchsreihe dient der Charakterisierung

[1]Wegen einer Unterbrechung der Stromversorgung kam es zu einem unerwünschten Auftauen der für die C-Peptid-Bestimmung vorgesehenen Serumproben für mehrere Stunden. Die anschließend erfolgte C-Peptid-Messung ergab so niedrige Konzentrationen, daß eine weitgehende Zerstörung vorhandener Konzentrationen angenommen werden muß und die Ergebnisse nicht verwertbar sind.

der Absorptionskinetik von Altinsulinen unter folgender spezieller Fragestellung: Hat der Proteaseninhibitor Aprotinin einen beschleunigenden Effekt auf die Absorption subkutan injizierten Altinsulins, ist dieser spezifisch für Aprotinin oder beruht er auf anderen Einflüssen wie der Volumenzunahme der Injektion oder der Aktivität des Lösungsmittels, und ist durch andere Substanzen, wie Eigenserum oder Protamin-Lösung ein ähnlicher Effekt zu erzielen.

Zunächst nahmen vier Versuchspersonen an fünf aufeinanderfolgenden Versuchstagen teil. In randomisierter Reihenfolge erhielten sie pro Tag jeweils eine der folgenden, unmittelbar vor der Applikation gemischten Injektionen:

10 I.E. Actrapid^{R} + 0,5ml Trasylol^{R}, entsprechend 10000 KIU,

10 I.E. Actrapid^{R} + 0,5ml NaCl-Lösung, 0,9%ig,

10 I.E. Actrapid^{R} + 0,5ml Benzyl-Alkohol-Lösung, das Lösungsmittel für Aprotinin im Trasylol^{R},

10 I.E. Actrapid^{R} + 0,5ml Eigenserum aus zuvor abgenommenem Blut, oder

10 I.E. Actrapid^{R} + 0,5ml Protamin, daß heißt 130nl Protamin "1000" Roche ad 0,5ml mit 0,9%iger NaCl-Lösung aufgefüllt.

Vier weiteren Probanden wurden lediglich an zwei Tagen die beiden zuerst genannten Injektionen mit Trasylol^{R}- bzw. NaCl-Zusatz verabreicht.

Für die Versuche erfolgte zum Zeitpunkt -10′ das Legen eines venösen Zugangs und zum Zeitpunkt 0′ die jeweilige Injektion. Die in ruhender Position verbrachte Beobachtungszeit betrug 130 Minuten mit Blutprobenentnahmen in 15-minütigen Abständen. Aus den entnommenen Proben wurden die Blutglukose- und Seruminsulinkonzentrationen bestimmt.

Zur Absorptionskinetik von Verzögerungsinsulinen wurden drei weitere Versuchsreihen durchgeführt, je eine zu den Insulinpräparationen NPH-Leo^{R}, Monotard^{R} und Mixtard^{R}. Mixtard^{R} besteht aus 70% NPH- und 30% Altinsulin. Alle Versuchsreihen waren in ihrem Aufbau völlig identisch und sollen neben der Charakterisierung der Absorption unter Ruhebedingungen insbesondere die Effekte von lokaler Wärmeanwendung, Muskelarbeit und Massage der Injektionsstelle klären. Dabei ist von Bedeutung, daß die auf ihre Wirkung hin untersuchten Maßnahmen erst 2 1/2 Stunden nach der Insulinapplikation durchgeführt wurden.

Jeder Versuchsreihe wurden sechs Probanden zugeordnet, die an vier aufeinanderfolgenden Tagen in randomisierter Reihenfolge an vier Versuchsprogrammen mit Kontrolle, Wärme, Massage und Muskelarbeit teilnahmen.

All diese Programme begannen mit dem Anlegen einer intravenösen NaCl-Infusion zum Zeitpunkt -10′ und der Injektion von 20 I.E. eines der Insulinpräparate zum Zeitpunkt 0′. Die Beobachtungszeit von der Injektion an betrug 240 Minuten. Während die Kontrollgruppe die gesamte Versuchszeit unter Ruhebedingungen verbrachte, wurden bei den übrigen Gruppen von 150 bis 180 Minuten post injectionem spezielle Maßnahmen angewandt: entweder Erwärmung des Injektionsgebietes durch Auflegen einer 40^{o}C warmen Wärmflasche oder Massage der Injektionsstelle oder Muskelarbeit in Form von Fahrradergometerbelastung. Dabei wurde die Massage nach genauen Instruktionen mit möglichst gleichbleibender Intensität von der Probanden selbst vorgenommen. Die auf dem Ergometer zu erbringende Leistung betrug ca. 100 Watt und war so bemessen, daß während des Radfahrens die Pulsfrequenz bei 110 bis 120 Schlägen pro Minute konstant blieb.

Blutproben wurden in den ersten 2 1/2 Stunden halbstündig und zu den Zeitpunkten 150′, 160′, 170′, 180′, 195′, 210′ und 240′ post injectionem entnommen. Sämtliche Proben dienten der Bestimmung von Blutglukose- und Seruminsulinkonzentrationen. Bei den Versuchsprogrammen "Kontrolle" und "Muskelarbeit" wurden außerdem zur Charakterisierung der Stoffwechsellage bei Ruhe- und Muskelarbeitsbedingungen noch die Konzentrationen der Metaboliten Lactat, Pyruvat, freie Fettsäuren und Ketokörper als Summe aus Acetoacetat und ß-Hydroxy-Butyrat, zu den Zeitpunkten -10′, 0′, 60′, 120′, 150′, 160′, 170′, 180′, 210′ und 240′ gemessen.

V Statistische Methoden

Zur Beurteilung der Ergebnisse wurden für alle gemessenen Parameter aus den Einzelkonzentrationen der 6 bzw. 8 Probanden die Mittelwerte (M), die Standardabweichungen (SD) und die Standardabweichungen der Mittelwerte (SEM) berechnet. Bei einem Niveau von $p < 0{,}05$ wurden geprüft:

die Konzentrationen zu den verschiedenen Zeitpunkten eines jeden Versuchsprogramms auf signifikante Unterschiede zu den Ausgangskonzentrationen im gepaarten t-Test,

die Konzentrationen der verschiedenen Versuchsprogramme einer jeden Versuchsreihe, daß heißt bei gleichen Probanden und Insulinpräparaten, auf signifikante Unterschiede zur jeweiligen Kontrollgruppe, ebenfalls im gepaarten t-Test, und

die Ergebnisse gleicher Versuchsprogramme der verschiedenen Versuchsreihen, daß heißt bei verschiedenen Probanden und Insulinpräparaten, auf signifikante Unterschiede untereinander, im ungepaarten t-Test.

Die Glukose- und Insulinkonzentrationen wurden in Konzentrations-Zeit-Kurven dargestellt. Zur weiteren Charakterisierung des zeitlichen Verhaltens der Serumsulinspiegel dienen noch folgende Parameter:

IRI_{max} = die Mittelwerte der maximal erreichten Einzelkonzentrationen des jeweiligen Versuchstages als Maß für die Höhe und

$T_{IRI_{max}}$ = die Mittelwerte der zu den Höchstkonzentrationen gehörenden Zeiten als Maß für die Steilheit der Insulin-Zeit-Kurve sowie

AUC = die Fläche unter der Insulin-Zeit-Kurve (Area under the curve), berechnet nach Klotz, 1979 (13). Dabei wurden für die Altinsulin-Versuche die Flächen unter den Insulin-Kurven in den ersten 75 Minuten post injectionem, AUC_{0-75}, und für die Verzögerungsinsulin-Versuche die Flächen in den besonders interressierenden Zeitintervallen während und kurz nach den zur Beeinflussung der Absorption angewandten Maßnahmen, $AUC_{160-210}$, berechnet.

BV Weiterhin dienten die oben genannten Flächen der Ermittlung der prozentualen Bioverfügbarkeit des absorbierten Insulins, BV_{0-75}, beziehungsweise $BV_{160-210}$, nach der Methode von Cüppers (5). Dabei ist die Bioverfügbarkeit bestimmt durch das prozentuale Verhältnis der jeweiligen Vergleichsfläche zur Standardfläche der Kontrollgruppe, die als 100% angenommen wird.

Auch hier wurden bei einem Niveau von $p \leq 0{,}05$ die Parameter gleicher Probandengruppen im gepaarten t-Test und die Parameter verschiedener Probandengruppen im ungepaarten t-Test auf signifikante Unterschiede geprüft.

C ERGEBNISSE

I Absorptionskinetik von Altinsulin

1. Kontrollen

Unter den beschriebenen Bedingungen erhielten acht Versuchspersonen subkutane Injektionen von jeweils 10 I.E. Actrapid^{R}. Im Anschluß daran kommt es schnell zu einem Anstieg der Seruminsulinspiegel: die Insulinkonzentrationen liegen schon 15 Minuten nach der Injektion signifikant über den Ausgangskonzentrationen von 7,0 $\pm$ 0,8 µU/ml. Nach weiterem Ansteigen erreichen sie 60 Minuten später ein Maximum (IRI_{max} = 25,2 $\pm$ 2,1 µU/ml und $T_{IRI_{max}}$ = 71 $\pm$ 8 min) und sinken dann so langsam wieder ab, daß sie auch zwei Stunden nach der Insulinapplikation noch signifikant über den Ausgangswerten liegen (Abb. 1, obere Graphik).

Die Fläche unter der Insulin-Zeit-Kurve, $AUC_{0-75'}$ beträgt 530 $\pm$ 134 µU/ml x min. Die hypoglykämische Wirkung des absorbierten Insulins zeigt sich an den Blutzuckerwerten. So kommt es zu einem deutlichen, ab 45 Minuten post injectionem signifikanten Absinken der Glukosekonzentrationen (Abb. 1, untere Graphik).

2. Effekte von Trasylol^{R} und Benzyl-Alkohol

An weiteren Versuchstagen mit denselben Probanden wurden die 10 I.E. Actrapid^{R} zur subkutanen Injektion mit Trasylol^{R}, einer Präparation des Proteaseninhibitors Aprotinin, gemischt. Nach Zugabe von Trasylol^{R} zur Insulininjektion kommt es zu einer Steigerung und Beschleunigung des Anstiegs der Insulinkonzentrationen: so liegen die erreichten Insulinspiegel im Bereich 15 bis 45 Minuten post injectio-

nem signifikant höher als nach alleiniger Actrapid^{R}-Applikation (Abb. 1, obere Graphik). Auch die Erniedrigung von $T_{IRI_{max}}$ auf 47 ± 5 min und die Erhöhung sowohl von IRI_{max} auf 30,2 ± 2,1 µU/ml als auch von AUC_{0-75} auf 1 152 ± 83 µU/ml x min zeigen diese signifikante Beschleunigung an. Die Bioverfügbarkeit, BV_{0-75} des Insulins erfährt eine statistisch gesicherte Steigerung auf 193 ± 35 % (Tab. 1). Im Einklang damit setzt der hypoglykämische Effekt des absorbierten Insulins entsprechend früher ein: der Blutzuckerabfall ist schon eine halbe Stunde nach der Insulinapplikation signifikant und die Glukosekonzentrationen liegen von 30 bis 60 Minuten post injectionem statistisch gesichert niedriger als nach alleiniger Actrapid^{R}-Injektion (Abb. 1, untere Graphik).

Das Lösungsmittel des Aprotinin im Trasylol^{R}, eine Benzyl-Alkohol-Lösung, hat keinerlei Auswirkungen auf die Insulinabsorption aus dem subkutanen Depot: in weiteren Versuchen mit vier der oben genannten Probanden wurde der Seruminsulin-Anstieg nach subkutaner Insulin-Applikation durch die Zugabe von Benzyl-Alkohol-Lösung zur Injektion nicht beeinflußt (Tab. 2). Sämtliche errechneten Parameter zur Charakterisierung des zeitlichen Verhaltens der Seruminsulinspiegel liegen im Bereich der zugehörigen Kontrollwerte (Tab. 1). Ebenso bleibt die durch die Insulininjektion hervorgerufene hypoglykämische Wirkung unverändert (Tab. 2).

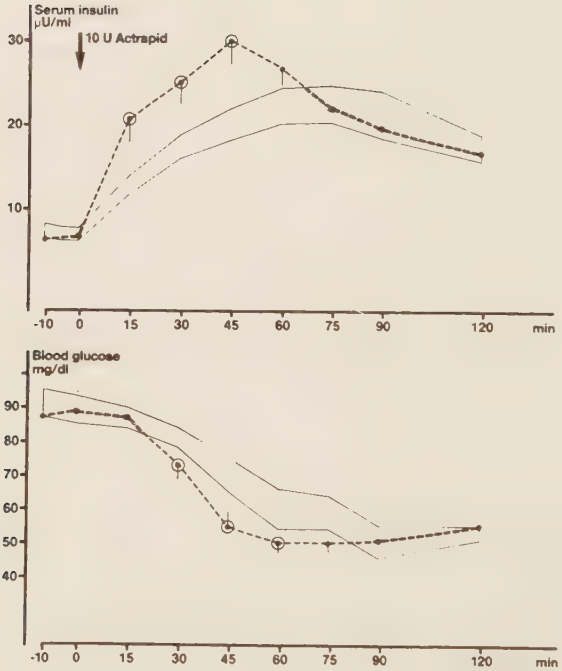

Abb. 1 Effekte von Aprotinin auf Seruminsulinanstieg (obere Graphik) und Blutzuckerabfall (untere Graphik) nach subkutaner Injektion von 10 I.E. Actrapid®.
Acht, gesunde, männliche Probanden erhielten subkutane Injektionen von je 10 I.E. Actrapid®, die zum Volumenausgleich mit 0,5ml 0,9%iger NaCl-Lösung aufgefüllt wurden, für die Kontrollversuche, und von je 10 I.E. Actrapid®, gemischt mit 0,5ml Trasylol®, entsprechend 10 000 Kallikrein-Inhibitor-Einheiten, für die Aprotininversuche. Die schraffierte Fläche stellt die Ergebnisse (M ± SEM) der Kontrollversuche dar, die gestrichelte Linie zeigt die Ergebnisse der Aprotininversuche. Eingekreiste Punkte sind im gepaarten t-Test bei einem Niveau von $p < 0,05$ signifikant verschieden von den jeweiligen Kontrollen.

3. Effekte von Eigenserum

Dagegen konnte bei denselben vier Versuchspersonen wie durch Trasylol^{R} auch durch Eigenserum eine Steigerung des Insulinanstiegs erzielt werden. Nach Zugabe von 0,5ml Eigenserum zum applizierten Insulin liegen zum Zeitpunkt 15 Minuten post injectionem die Insulinkonzentrationen signifikant über dem zugehörigen Kontrollwert (Abb. 2). Weiterhin ist auch die Fläche unter der Hormonkurve (AUC_{0-75} = 1 378 ± 222 µU/ml x min im Vergleich zu AUC_{0-75} = 771 ± 150 µU/ml x min bei den Kontrollen, n = 4) signifikant gesteigert.
Dagegen sind weder bei IRI_{max} mit 43,2 ± 8,9 µU/ml gegen 25,1 ± 3,9 µU/ml, bei $T_{IRI_{max}}$ mit 56 ± 4 min gegen 68 ± 8 min oder bei BV_{0-75} mit 177 ± 63 % (Tab. 1), noch im Verlauf der Glukose-Zeit-Kurven (Tab, 2) signifikante Veränderungen aufgetreten.

4. Effekte von Protamin

Im Gegensatz zu den aufgezeigten Effekten bewirkt der Zusatz von Protaminlösung zum applizierten Altinsulin keine Steigerung des Seruminsulin-Anstiegs, sondern verhindert diesen. Nachdem die 10 I.E. Actrapid^{R} zur Injektion bei den vier Probanden in weiteren Versuchen mit 0,5ml Protaminlösung - 130ml Protamin "1000" Roche ad 0,5ml mit 0,9%iger NaCl-Lösung aufgefüllt - gemischt wurden, kam es nicht zu einem Anstieg der Insulinkonzentrationen über die Ausgangswerte. Somit liegen ab 45 Minuten post injectionem die Insulinspiegel signifikant unter den Kontrollen ohne Protamin-Zusatz und bleiben es bis zum Ende der Versuche. Entsprechend sinken die Glukosekonzentrationen nicht unter die Nüchternwerte und liegen ebenfalls ab 45 Minuten nach der Injektion signifikant über den Kontrollwerten (Tab. 2).

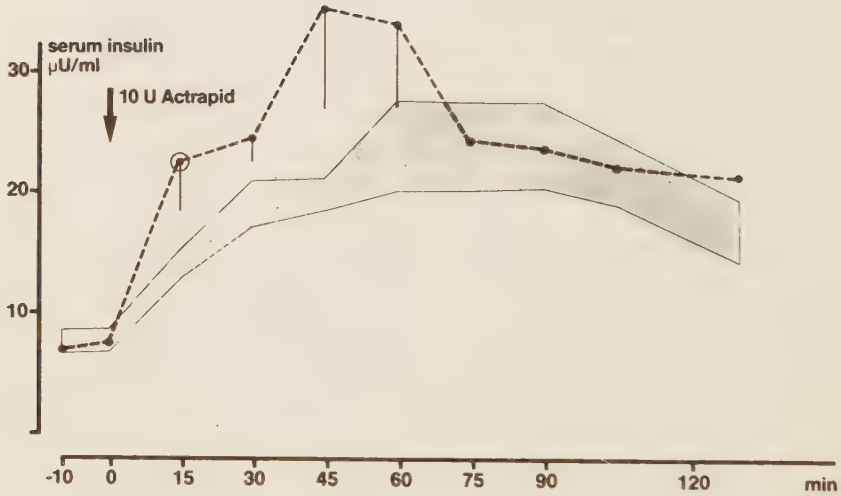

Abb. 2 Effekt von Zugabe von 0,5ml Eigenserum auf den Seruminsulin-Anstieg nach subkutaner Injektion von 10 I.E. Actrapid®, bei vier gesunden, männlichen Probanden.
Die schraffierte Fläche zeigt die Mittelwerte und deren Standardabweichungen (M ± SEM) der Kontrollversuche. Bei diesen wurde eine mit 0,5ml 0,9%iger NaCl-Lösung gemischte Actrapid®-Injektion verabreicht. Die gestrichelte Linie zeigt die Konzentrationen nach Zugabe von 0,5ml Eigenserum zur Injektion. Der eingekreiste Punkt ist im gepaarten t-Test bei einem Niveau von $p < 0,05$ signifikant verschieden von dem dazugehörigen Kontrollpunkt.

II Absorptionskinetik von Verzögerungsinsulinen

1. Kontrollen

Zur Charakterisierung der Absorptionskinetik von Verzögerungsinsulinen wurden achtzehn weitere Probanden untersucht. Je sechs von ihnen erhielten an vier verschiedenen Versuchstagen subkutane Injektionen von entweder 20 I.E. NPH-Leo^{R}, von 20 I.E. Monotard^{R} oder von 20 I.E. Mixtard^{R}, unter den oben beschriebenen Versuchsbedingungen.
An einem der Versuchstage verbrachten die Probanden die gesamte Beobachtungszeit in Ruhe, an den übrigen Tagen wurden 150 Minuten nach der Injektion des Insulins spezielle Maßnahmen ergriffen, um sie auf ihren Einfluß auf die Absorption des applizierten Insulins hin zu untersuchen: lokale Wärmeanwendung, Muskelarbeit und Massage der Injektionsstelle. Dazu mußten die Probanden an je einem der Versuchstage 150 Minuten post injectionem für die Dauer von 30 Minuten entweder eine 40^{o}C heiße Wärmflasche auf die Injektionsstelle legen, oder auf dem Fahrradergometer eine Leistung von 100 Watt bei einem Puls von 110 bis 120 Schlägen pro Minute erbringen, oder das Gewebe der Injektionsstelle gleichmäßig massieren.
Unter Ruhebedingungen (n=24) kommt es nach NPH-Leo^{R}-Applikation zu einem Anstieg des Seruminsulins von Ausgangskonzentrationen von 6,8 $\pm$ 0,4 μU/ml, der ab 90 Minuten post injectionem signifikant ist (Abb. 3).

Ein ganz ähnliches Verhalten zeigen die Seruminsulinkonzentrationen nach Applikation von Monotard^{R} (ebenfalls n=24). Auch hier ist der Anstieg von den Ausgangswerten von 6,3 $\pm$ 0,3 μU/ml ab 90 Minuten post injectionem signifikant und in den Kurvenverläufen nach NPH-Leo^{R}- und nach Monotard^{R}-Injektion liegen keine statistisch zu sichernden Unterschiede vor.

In gutem Einklang damit steht das Verhalten der Blutglukosekonzentrationen: bei beiden Versuchsgruppen treten nach dem Insulinanstieg Blutzuckerabfälle auf, die ab 120 Minuten nach der NPH-Leo^{R}- und 150 Minuten nach der Monotard^{R}-Injektion statistisch zu sichern sind. Auch hier unterscheiden sich die Werte nach Injektion der beiden Präparate nicht signifikant voneinander (Tab. 8).
Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse nach Injektion von Mixtard^{R}. Der Anstieg der Seruminsulinkonzentrationen von Ausgangswerten um 5,9 $\pm$ 0,2 µU/ml ist schon eine halbe Stunde nach der Applikation signifikant, und von da an unterscheiden sich die Konzentrationen sowohl von denen nach Monotard^{R}-Injektion als auch von denen nach NPH-Leo^{R}-Injektion (Abb. 3). Daneben ist der aufgetretene Abfall der Glukosekonzentrationen ebenfalls früher, daß heißt, ab 60 Minuten nach der Injektion signifikant, und von diesem Zeitpunkt an liegen die Werte unter den Werten nach Monotard^{R}- beziehungsweise nach NPH-Leo^{R}-Injektion (Tab. 8).

Für jedes untersuchte Verzögerungspräparat wurden bei den sechs vier Stunden unter Ruhebedingungen beobachteten Probanden neben Glukose und Insulin noch weitere Parameter bestimmt: die Lactat- und Pyruvatkonzentrationen zeigen nach Injektion von keinem der untersuchten Präparate eine Änderung im Vergleich zu den Ausgangskonzentrationen. Die Ketokörper als Summe aus Acetoacetat und ß-Hydroxy-Butyrat zeigen nach NPH-Leo^{R}-Applikation keine, nach Monotard^{R}-Applikation nur bei 170 Minuten post injectionem signifikante und nach Mixtard^{R}-Applikation von 170 bis 210 Minuten post injectionem signifikante Steigerungen über die Ausgangswerte. Die Freien Fettsäuren sinken nach Injektion sämtlicher Präparate signifikant ab, nach NPH-Leo^{R}-Gabe ab 120′, nach Monotard^{R}-Gabe ab 150′ und nach Mixtard^{R}-Gabe ab 60′ post injectionem, und bleiben bis zum Versuchsende erniedrigt (Tab. 3, Tab. 4, Tab. 5).

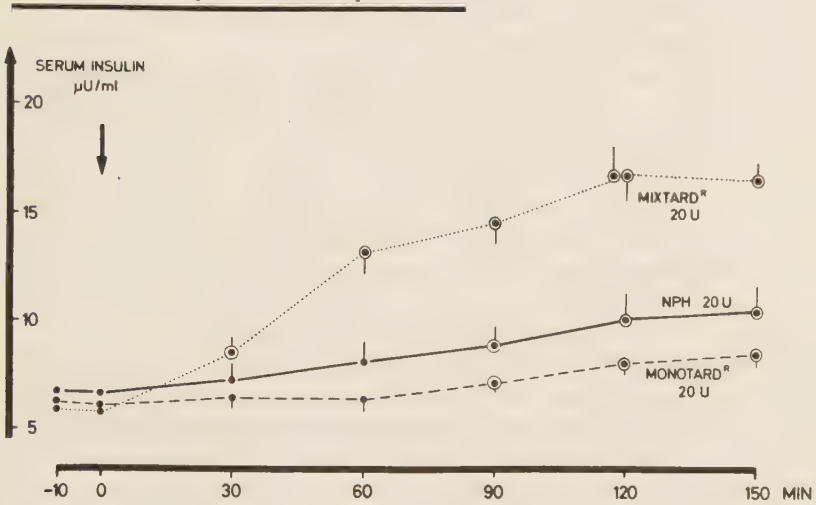

Abb. 3 Seruminsulinspiegel nach subkutaner Injektion von je 20 I.E. NPH-Leo®-, Monotard®- oder Mixtard®-Insulin unter Ruhebedingungen. Untersucht wurden gesunde, normalgewichtige Männer zwischen 21 und 29 Jahren. Die punktierte Linier stellt die Konzentrationen (M_R ± SEM) für n = 20 nach Applikation von Mixtard® dar, die durchgezogene Linie die für n = 24 nach Gabe von NPH-Leo® und die gestrichelte die für n = 24 nach Gabe von Monotard®. Eingekreiste Punkte sind bei einem Niveau von $p < 0,05$ im gepaarten t-Test signifikant verschieden von den jeweiligen Ausgangswerten. Ab 60 min post injectionem unterscheiden sich die Konzentrationen sowohl nach Monotard® als auch nach NPH-Leo®-Gabe im ungepaarten t-Test ebenfalls bei $p < 0,05$ signifikant von den nach Mixtard®-Gabe erreichten Konzentrationen.

2. Veränderungen durch lokale Wärmeanwendung

Die lokale Wärmeanwendung ruft bei keinem der untersuchten Verzögerungspräparate eine signifikante Änderung des Seruminsulin-Anstiegs nach subkutaner Injektion hervor (Tab. 6).
Alle anderen Parameter wie IRI_{max}, $AUC_{160-210}$ und $BV_{160-210}$ bleiben (Tab. 7) ebenso wie der Blutzuckerabfall (Tab. 6) unverändert.

3. Veränderungen durch Muskelarbeit

Die 30minütige Fahrradergometerbelastung 2 1/2 Stunden nach Insulininjektion hat bei allen drei Verzögerungsinsulinen den gleichen Effekt auf die Stoffwechselparameter Lactat, Pyruvat, Ketokörper und freie Fettsäuren: die Konzentrationen der freien Fettsäuren bleiben im Vergleich zu den Konzentrationen der unter körperlichen Ruhebedingungen durchgeführten Kontrollversuche unverändert. Lactat, Pyruvat und Ketokörper dagegen steigen unter der körperlichen Belastung signifikant an (Tab. 3,4 und 5).
Im Gegensatz dazu werden unterschiedliche Effekte auf die Seruminsulin-Konzentrationen deutlich. Der Insulin-Anstieg sowohl nach NPH-Leo^{R}- als auch nach Monotard^{R}-Applikation wird durch die Muskelarbeit nicht alteriert (Abb. 4 und 5, jeweils obere Graphik). Ebensowenig werden Blutzuckerabfall (Abb. 4 und 5, jeweils untere Graphik) und IRI_{max}, $AUC_{160-210}$ und $BV_{160-210}$ (Tab. 7) beeinflußt.
Nach Injektion von Mixtard^{R}-Insulin dagegen bewirkt die Fahrradergometerbelastung eine Absorptionssteigerung. Die Insulinkonzentrationen liegen zu den Zeitpunkten 170′ und 180′ post injectionem signifikant über den jeweiligen Kontrollwerten (Abb. 6, obere Graphik). Auch die biologische Verfügbarkeit des Insulins, $BV_{160-210}$ ist mit 16o $\pm$ 26 % signifikant gesteigert,

während IRI_{max} und $AUC_{160-210}$ (Tab. 7) ebensowenig wie der Glukoseabfall (Abb. 6, untere Graphik) verändert werden.

4. Veränderungen durch Massage der Injektionsstelle

Die Massage der Injektionsstelle hat bei allen Versuchsgruppen eine Steigerung des Seruminsulin-Anstiegs zufolge. Während die Insulinkonzentrationen nach subkutaner Applikation von NPH-Leo^{R} durch die Massage zum Zeitpunkt 180 Minuten post injectionem signifikant über den zugehörigen Kontrollwert steigt (Abb. 4, obere Graphik), zeigt der Blutglukose-Abfall (Abb. 4, untere Graphik) wie auch IRI_{max}, $AUC_{160-210}$ und $BV_{160-210}$ (Tab. 7) keine statistisch zu sichernden Änderungen.

Nach subkutaner Applikation von Monotard^{R}-Insulin ruft die Massage eine signifikante Erhöhung der Insulinkonzentrationen über die Kontrollen von 170 bis 195 Minuten post injectionem hervor (Abb. 5 obere Graphik). Hier erfahren die Glukosewerte eine massive Erniedrigung. Sie liegen von 170 Minuten nach der Injektion bis zum Ende der Beobachtungszeit signifikant unter den Kontrollen (Abb. 5, untere Graphik). Auch IRI_{max} mit $18,3 \pm 2,5$ µU/ml gegen $11,3 \pm 1,3$ µU/ml der Kontrollen ist signifikant gesteigert, wohingegen $AUC_{160-210}$ und $BV_{160-210}$ unverändert sind (Tab. 7).

Nach subkutaner Applikation von Mixtard^{R}-Insulin zeigt die Massage der Injektionsstelle die ausgeprägtesten Effekte. Die von 160 bis 240 Minuten post injectionem signifikante Steigerung des Seruminsulin-Anstiegs nach Mixtard^{R}-Injektion (Abb. 6, obere Graphik) geht mit einer in den letzten 45 Versuchsminuten signifikanten Senkung der Blutzuckerspiegel unter die Kontrollwerte einher (Abb. 6, untere Graphik).

IRI_{max} mit 30,2 ± 3,1 µU/ml gegen 16,4 ± 1,3 µU/ml, $AUC_{160-210}$ mit 970 ± 127 µU/ml x min gegen 482 ± 68 µU/ml x min und $BV_{160-210}$ mit 217 ± 44 % liegen signifikant über den zugehörigen Kontrollwerten (Tab. 7).

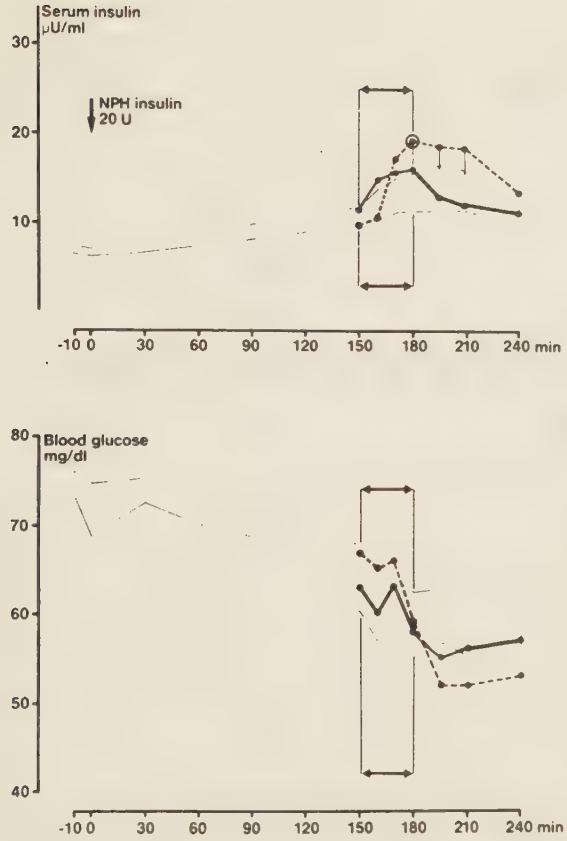

Abb. 4 Effekte von Muskelarbeit und von Massage auf die Seruminsulinspiegel (obere Graphik) und die Blutzuckerspiegel (untere Graphik) nach subkutaner Injektion von 20 I.E. NPH-Leo®.
6 Probanden wurden ab 150′ post injectionem 30 Minuten lang einer Fahrradergometerbelastung mit einer Leistung von 100 Watt und weiterhin einer leichten Massage der Injektionsstelle unterzogen. Die Kontrollversuche verbrachten sie unter Ruhebedingungen. Die schraffierte Fläche stellt die Werte der Kontrollen (M ± SEM) dar, die durchgezogene Linie die Werte während und nach der Muskelarbeit und die gestrichelte Linie die Werte während und nach der Massage. Der eingekreiste Punkt ist im gepaarten t-Test bei $p < 0{,}05$ signifikant verschieden vom zugehörigen Kontrollpunkt.

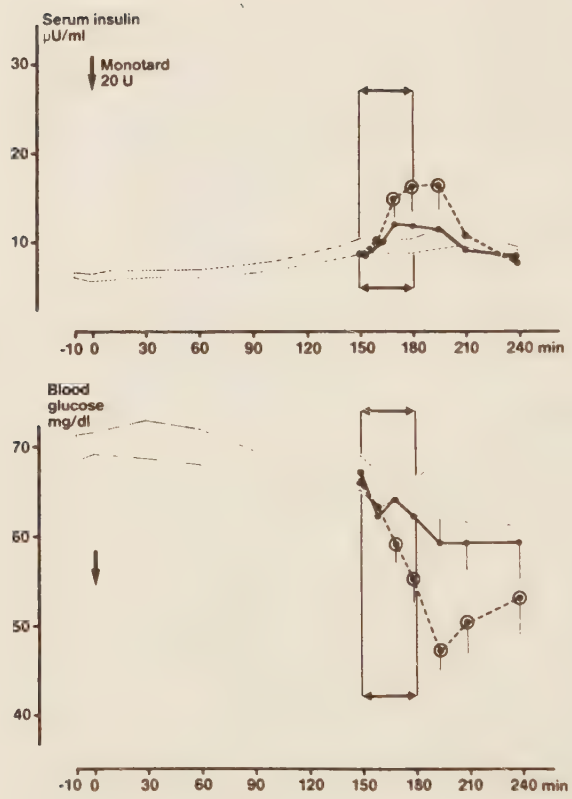

Abb. 5 Effekte von Muskelarbeit und von Massage auf die Seruminsulinspiegel (obere Graphik) und die Blutzuckerspiegel (untere Graphik) nach subkutaner Injektion von 20 I.E. Monotard®.
6 Probanden wurden 150′ post injectionem 30 Minuten lang einer Fahrradergometerbelastung mit einer Leistung von 100 Watt, und weiterhin einer leichten Massage der Injektionsstelle unterzogen. Die Kontrollversuche verbrachten sie unter Ruhebedingungen. Die schraffierte Fläche stellt die Werte der Kontrollen (M ± SEM) dar, die durchgezogene Linie die Werte während und nach der Muskelarbeit und die gestrichelte Linie die Werte während und nach der Massage. Eingekreiste Punkte sind im gepaarten t-Test bei $p < 0,05$ signifikant verschieden von den jeweiligen Kontrollpunkten.

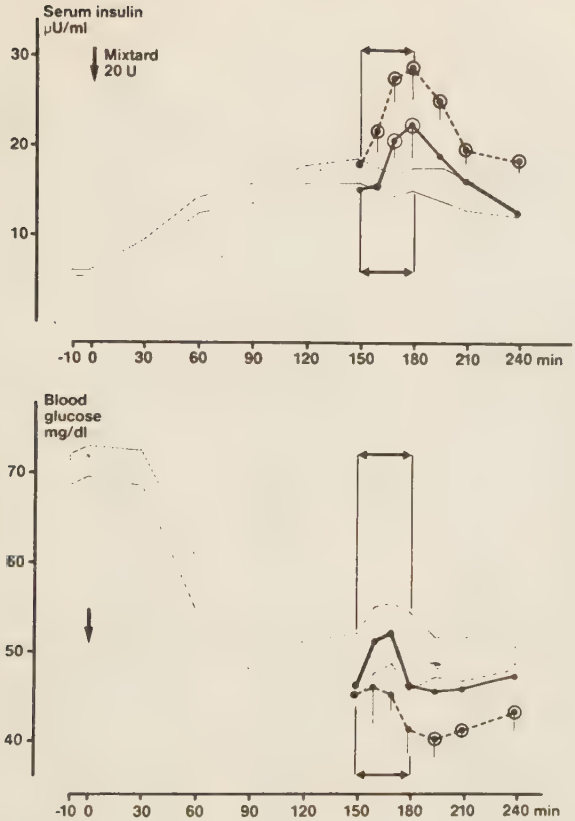

Abb. 6 Effekte von Muskelarbeit und von Massage auf die Seruminsulinspiegel (obere Graphik) und die Blutzuckerspiegel (untere Graphik) nach subkutaner Injektion von 20 I.E. Mixtard®.
5 Probanden wurden 150′ post injectionem 30 Minuten lang einer Fahrradergometerbelastung mit einer Leistung von 100 Watt, und weiterhin einer leichten Massage der Injektionsstelle unterzogen. Die Kontrollversuche verbrachten sie unter Ruhebedingungen. Die schraffierte Fläche stellt die Werte der Kontrollen (M $\pm$ SEM) dar, die durchgezogene Linie Werte während und nach der Muskelarbeit und die gestrichelte Linie die Werte während und nach der Massage. Eingekreiste Punkte sind im gepaarten t-Test bei $p < 0{,}05$ signifikant verschieden von den jeweiligen Kontrollpunkten.

Tab. 1 Effekte von Zugabe von 0,5ml Trasylol^R, n=8, von 0,5ml Benzyl-Alkohol-Lösung, n=4, und von 0,5ml Eigenserum, n=4, zur subkutanen Injektion von 10 I.E. Actrapid^R auf IRI_{max}, $T_{IRI_{max}}$, AUC_{0-75} oberhalb der Werte bei 0′ und BV_{0-75}.

Die Injektionen der Kontrollen wurden mit 0,5ml 0,9%iger NaCl-Lösung auf ein gleiches Volumen aufgefüllt. + kennzeichnet Werte, die bei einem Niveau von p 0,05 im gepaarten t-Test signifikant verschieden von den Kontrollwerten sind.

	IRI_{max} µU/ml	$T_{IRI_{max}}$ min	AUC_{0-75} µU/ml x min	BV_{0-75} %
NaCl-Lsg n=8	25,2±2,3	71±8	529±134	100±25
Trasylol^R n=8	30,3±2,1$^+$	47±5$^+$	1152±83$^+$	193±35$^+$
NaCl-Lsg n=4	25,1±3,9	68±8	771±150	100±20
Benzyl-Alkohol n=4	30,3±4,0	53±4	1091±171	174±62
Serum n=4	42,3±8,9	56±4	1378±222$^+$	177±63

Tab. 2 Effekte von Zugabe von 0,5ml Protamin-Lösung, von 0,5ml Benzyl-Alkohol-Lösung und von 0,5ml Eigenserum zur subkutanen Injektion von 10 I.E. Actrapid^{R} auf die Seruminsulin- und Blutglukosekonzentrationen, für n=4.

Die Injektionen der Kontrollen wurden mit 0,9%iger NaCl-Lösung ebenfalls auf 0,5ml aufgefüllt. $^{+}$ kennzeichnet Werte, die bei einem Niveau von $p < 0,05$ im gepaarten t-Test signifikant verschieden von den Kontrollwerten sind; ^{o} kennzeichnet Werte, die ebenfalls bei $p < 0,05$ im gepaarten t-Test signifikant verschieden von den jeweiligen Ausgangskonzentrationen sind.

min	Benzyl-Alkohl-Lsg		NaCl-Lsg		Protamin-Lsg		Eigenserum
	B-Glukose mg/dl	S-Insulin µU/ml	B-Glukose mg/dl	S-Insulin µU/ml	B-Glukose mg/dl	S-Insulin µU/ml	B-Glukose mg/dl
-15	77±4	7,3±1,5	83±5	7,4±1,0	86±4	8,8±0,5	86±2
0	77±3	7,3±1,6	83±5	7,4±1,1	84±2	9,0±1,0	84±3
15	75±3	10,5±3,9	82±5	13,9±1,6^{o}	84±4	8,0±1,5	84±3
30	69±4^{o}	23,0±3,0^{o}	77±4	18,8±1,9^{o}	83±3	11,8±4,3	75±2^{o}
45	55±5^{o}	24,7±2,8^{o+}	67±5^{o}	19,5±1,3^{o}	80±3^{+}	11,3±3,8^{+}	66±5^{o}
60	48±5^{o}	25,0±2,1^{o}	57±3^{o}	23,9±3,4^{o}	82±2^{+}	8,8±1,8^{+}	56±6^{o}
75	47±4^{o}	25,2±1,9^{o}	49±2^{o}	23,5±3,8^{o}	84±2^{+}	7,9±1,2^{+}	50±5^{o}
90	49±3^{o}	21,8±1,2^{o}	42±3^{o}	23,6±3,5^{o}	82±2^{+}	7,8±1,9^{+}	50±3^{o}
105	51±3^{o}	19,8±1,3^{o}	45±2^{o}	22,0±3,3^{o}	83±2^{+}	8,1±1,1^{+}	52±2^{o}
120	51±2^{o}	16,0±2,5^{o}	53±1^{o}	17,6±1,7^{o}	82±2^{+}	6,5±0,9^{+}	51±3^{o}

Tab. 3 Stoffwechseleffekte von 30minütiger Fahrradergometerbelastung von 150 bis 180 Minuten nach der subkutanen Injektion von 20 I.E. NPH-Leo^{R} bei Normalpersonen.

n=6 für Blutglukose, n=4 für die übrigen Parameter. $^{+}$ kennzeichnet Werte, die im gepaarten t-Test bei $p < 0,05$ signifikant verschieden von den Kontrollwerten, und ^{o} von den Ausgangswerten sind.

	KONTROLLEN					MUSKELARBEIT				
min	Lactat mmol/l	FFS umol/l	Pyruvat mmol/l	Gluk. mg/dl	Ketokörper mmol/l	Lactat mmol/l	FFS umol/l	Pyruvat mmol/l	Gluk. mg/dl	Ketokörper mmol/l
-10	1,01±0,09	274±34	0,07±0,01	74±3	0,12±0,02	0,94±0,14	241±41	0,05±0,01	74±3	0,17±0,06
0	0,78±0,08	245±29	0,06±0,01	74±3	0,14±0,04	0,92±0,13	235±67	0,07±0,01	73±3	0,27±0,12
60	0,88±0,04	175±56	0,07±0,01	69±4	0,12±0,04	0,74±0,08	216±32	0,06±0,01	72±3	0,13±0,08
120	0,91±0,07	141±26^{o}	0,07±0,01	65±4	0,10±0,01	0,92±0,08	157±25	0,07±0,01	66±3	0,11±0,04
150	0,87±0,08	138±16^{o}	0,08±0,01	62±4^{o}	0,13±0,02	0,93±0,05	143±24	0,08±0,01^{o}	63±4^{o}	0,12±0,02
160	0,91±0,06	136±20^{o}	0,07±0,01	62±5^{o}	0,12±0,03	1,44±0,26^{+}	152±19	0,10±0,01^{o+}	60±4^{o}	0,24±0,06
170	0,86±0,09	126±19^{o}	0,08±0,00	60±4^{o}	0,12±0,02	2,10±0,55^{o+}	133±05^{o}	0,12±0,01^{o+}	60±2^{o}	0,41±0,06^{o+}
180	0,87±0,07	118±17^{o}	0,07±0,00	59±4^{o}	0,11±0,04	2,78±0,72^{o+}	137±21	0,14±0,01^{o+}	58±2^{o}	0,48±0,11^{o+}
210	0,75±0,02	112±15^{o}	0,07±0,01	58±4^{o}	0,18±0,04	1,13±0,17^{+}	138±06^{o}	0,10±0,01^{o}	56±3^{o}	0,13±0,03
240	0,83±0,04	110±11^{o}	0,07±0,01	58±3^{o}	0,11±0,02	0,89±0,07	167±49	0,08±0,02	57±3^{o}	0,12±0,03

Tab. 4 Stoffwechseleffekte von 30minuütiger Fahrradergometerbelastung von 150 bis 180 Minuten nach der subkutanen Injektion von 20 I.E. Monotard^{R} bei Normalpersonen.

n=6 für Blutglukose, n=4 für die übrigen Parameter. $^{+}$ kennzeichnet Werte, die im gepaarten t-Test bei $p < 0,05$ signifikant verschieden von den Kontrollwerten, ^{o} von den Ausgangswerten sind.

	K O N T R O L L E N					M U S K E L A R B E I T				
min	Lactat mmol/l	FFS umol/l	Pyruvat mmol/l	Glukose mg/dl	Ketokörper mmol/l	Lactat mmol/l	FFS umol/l	Pyruvat mmol/l	Glukose mg/dl	Ketokörper mmol/l
-10	0,77±0,12	327±55	0,06±0,01	73±3	0,12±0,01	0,79±0,22	288±51	0,06±0,01	70±3	0,24±0,01
0	0,80±0,15	330±43	0,07±0,00	73±3	0,12±0,01	0,75±0,11	277±62	0,05±0,00	71±4	0,17±0,05
60	0,73±0,06	241±48	0,08±0,01	73±3	0,13±0,01	0,78±0,05	202±20	0,06±0,01	71±4	0,15±0,01
120	0,67±0,02	207±48	0,07±0,01	69±2^{o}	0,13±0,01	0,77±0,08	198±32	0,05±0,01	68±4	0,14±0,02
150	0,71±0,04	174±37^{o}	0,07±0,02	67±2^{o}	0,12±0,02	0,79±0,08	169±24^{o}	0,05±0,01	67±2	0,14±0,02
160	0,74±0,02	174±49^{o}	0,06±0,01	65±2^{o}	0,15±0,02	1,97±0,49^{o+}	166±40	0,10±0,02	62±2^{o}	0,19±0,01^{+}
170	0,73±0,03	141±31^{o}	0,06±0,01	66±2^{o}	0,17±0,01^{o}	4,26±1,43^{o+}	189±53	0,16±0,05^{o+}	59±5^{o}	0,33±0,02^{o+}
180	0,70±0,02	129±22^{o}	0,07±0,00	64±2^{o}	0,16±0,01	3,32±0,17^{o+}	224±60	0,12±0,03^{o}	58±4^{o}	0,36±0,02^{o+}
210	0,53±0,16	132±26^{o}	0,06±0,00	64±3^{o}	0,15±0,01^{o}	1,36±0,13^{o+}	204±57	0,08±0,02	58±4^{o}	0,19±0,03
240	0,66±0,02	123±14^{o}	0,07±0,01	64±3^{o}	0,14±0,03	0,74±0,64	223±79	0,07±0,01	60±5^{o}	0,17±0,04

Tab. 5 Stoffwechseleffekte von 30minütiger Fahrradergometerbelastung von 150 bis 180 Minuten nach der subkutanen Injektion von 20 I.E. Mixtard^{R} bei Normalpersonen.

n=6. $^{+}$kennzeichnet Werte, die im gepaarten t-Test bei $p < 0,05$ signifikant verschieden von den zugehörigen Kontrollwerten, und ^{o} von den Ausgangswerten sind.

	KONTROLLEN					MUSKELARBEIT				
min	Lactat mmol/l	FFS umol/l	Pyruvat mmol/l	Gluk. mg/dl	Ketokörper mmol/l	Lactat mmol/l	FFS umol/l	Pyruvat mmol/l	Gluk. mg/dl	Ketokörper mmol/l
-10	1,06±0,12	366±97	0,06±0,01	67±4	0,15±0,03	0,94±0,04	274±58	0,06±0,01	69±4	0,09±0,02
0	0,96±0,04	325±57	0,06±0,01	69±4	0,17±0,02	0,86±0,02	311±32	0,06±0,01	69±4	0,11±0,01
60	0,82±0,07	176±32^{o}	0,06±0,01	60±3	0,12±0,02	0,77±0,05	154±21^{o}	0,05±0,01	57±8	0,10±0,02
120	1,01±0,17	141±15^{o}	0,07±0,01	52±5^{o}	0,14±0,02	0,82±0,08	148±44^{o}	0,06±0,01	51±5^{o}	0,20±0,12
150	0,94±0,12	157±39^{o}	0,07±0,01	52±5^{o}	0,11±0,03	0,85±0,10	156±38^{o}	0,07±0,01	46±5^{o}	0,20±0,13
160	0,92±0,14	146±38^{o}	0,07±0,01	51±4^{o}	0,14±0,03	1,84±0,26^{o+}	145±34^{o}	0,14±0,03^{o+}	51±6^{o}	0,57±0,20^{o+}
170	0,92±0,13	149±38^{o}	0,07±0,01	52±4^{o}	0,12±0,01^{o}	2,21±0,36^{o+}	112±19^{o}	0,15±0,03^{o+}	52±5^{o}	0,80±0,33^{o+}
180	0,86±0,09	149±40^{o}	0,06±0,01	50±5^{o}	0,13±0,01	1,25±0,12^{o+}	119±17^{o}	0,14±0,03^{o+}	46±5^{o}	0,67±0,38^{o}
210	0,86±0,06	143±43^{o}	0,07±0,01	49±3^{o}	0,16±0,03	1,07±0,10	235±62	0,11±0,03^{o+}	45±4^{o}	0,21±0,09
240	1.06±0,15	190±53	0,06±0,01	50±2^{o}	0,19±0,05	0,99±0,13	282±77	0,07±0,01	47±3^{o}	0,25±0,06^{o}

Tab. 6 Effekte von lokaler Wärmeanwendung - Auflegen einer 40°C warmen Wärmflasche - von 150 bis 180 Minuten nach der Injektion von 20 I.E. NPH-Leo^{R} für n=6, von 20 I.E. Monotard^{R} für n=6 und von 20 I.E. Mixtard^{R} für n=4 auf die Seruminsulin- und Blutglukosekonzentrationen.

Im gepaarten t-Test bei p 0,05 sind der mit + gekennzeichnete Punkt vom zugehörigen ohne lokale Erwärmung gewonnene Punkt und die mit o gekennzeichneten Werte von den jeweiligen Ausgangswerten signifikant verschieden.

	NPH-Leo^{R}		Monotard^{R}		Mixtard^{R}	
min	B-Glukose mg/dl	S-Insulin µU/ml	B-Glukose mg/dl	S-Insulin µU/ml	B-Glukose mg/dl	S-Insulin µU/ml
-10	75±2	6,9±0,6	65±5	6,0±0,9	78±3	6,8±0,8
0	75±2	7,0±0,7	66±5	5,8±0,9	79±4	5,9±0,6
30	75±2	7,7±1,7	66±5	6,1±1,0	78±3	9,0±1,1
60	72±3	8,2±1,9	66±5	6,4±1,0	63±4°	13,0±2,5°
90	72±3	8,4±1,8	65±6	7,7±1,0	52±7°	16,0±2,7°
120	67±4	8,7±2,0	65±6	8,9±1,6	49±6°	19,5±3,3°
150	66±4°	9,6±1,1	59±7	9,6±1,8	50±3°	17,3±2,6°
160	66±4°	11,2±0,9°	62±5	11,2±1,8	52±3°	20,3±2,3°
170	64±4°	12,5±0,9°	59±5	10,9±1,8°	52±1°	21,5±3,0°+
180	61±4°	14,8±1,1°	58±4	11,3±2,0°	49±3°	18,3±1,9°
195	58±5°	13,5±1,4°	57±5	9.9±1,5°	47±3°	15,3±2,0°
210	58±5°	11,3±5,1°	58±4	8,6±1,3	49±4°	14,1±1,1°
240	63±4	10,2±0,4°	60±5	8,5±1,3	53±2°	12,6±1,2°

Tab. 7 Effekte von 30minütiger Wärme (Auflegen einer 40°C warmen Wärmflasche), Massage und Muskelarbeit (Fahrradergometerbelastung bei einer Leistung von 100 Watt) 150 Minuten nach subkutaner Injektion von 20 I.E. NPH-Leo^{R}, Monotard^{R} oder Mixtard^{R} auf IRI_{max}, $AUC_{160-210}$ und $BV_{160-210}$.

\+ kennzeichnet Werte, die im gepaarten t-Test bei p 0,05 signifikant verschieden von den zugehörigen Kontrollwerten, die unter Ruhebedingungen gewonnen wurden, sind.

		IRI_{max} µU/ml	$AUC_{160-210}$ µU/ml x min	$BV_{160-210}$ %
NPH-Leo^{R}	Kontrolle n=6	14,8±2,6	336±118	100± 32
	Massage n=6	18,6±3,7	577± 94	145± 75
	Fahrrad n=6	17,5±4,0	399±162	169± 58
	Wärme n=6	15,5±1,2	329± 50	116± 43
Monotard^{R}	Kontrolle n=6	11,3±1,3	178± 45	100± 25
	Massage n=6	18,3±2,5^{+}	359±100	164±117
	Fahrrad n=6	13,3±2,0	278± 53	229± 99
	Wärme n=6	12,8±2,2	229± 84	112± 37
Mixtard^{R}	Kontrolle n=6	16,4±1,3	482± 68	100± 16
	Massage n=6	30,2±3,1^{+}	970±127^{+}	217± 44^{+}
	Fahrrad n=6	23,0±3,7	694±153	160± 26^{+}
	Wärme n=4	21,6±2,9	634±140	117± 23

Tab. 8 Blutglukosespiegel nach subkutaner Injektion von je 20 I.E. NPH-Leo^{R}-, Monotard^{R}- oder Mixtard^{R}-Insulin unter Ruhebedingungen, für n=22 bzw. n=24.

Mit ^{o} gekennzeichnete Werte sind im gepaarten t-Test bei p_{+} 0,05 signifikant verschieden von den jeweiligen Ausgangswerten, mit $^{+}$ gekennzeichnete Werte sind im ungepaarten t-Test ebenfalls bei p 0,05 signifikant verschieden von den nach Mixtard^{R}-Applikation erreichten Werten.

B-Glukose in mg/dl

min	NPH-Leo^{R} n=24	Monotard^{R} n=24	Mixtard^{R} n=22
-10	75±1	69±2	70±2
0	72±3	70±2	71±2
30	74±1	71±2	70±2
60	71±2 $^{+}$	70±2 $^{+}$	57±3^{o}
90	70±1 $^{+}$	66±2 $^{+}$	50±3^{o}
120	66±2^{o+}	68±2 $^{+}$	49±3^{o}
150	65±2^{o+}	65±2^{o+}	48±2^{o}

E DISKUSSION

Zur Erfassung der Absorptionskinetik subkutan injizierten Insulins gibt es verschiedene Methoden. Die Mehrzahl der bislang durchgeführten Untersuchungen bediente sich der 1969 von Binder beschriebenen indirekten Methode (6). Dabei wird den Versuchspersonen mit ^{125}J markiertes Insulin subkutan appliziert, und anschließend mit einem Geigerzähler die Abnahme der Radioaktivität über dem Hautareal der Injektion gemessen. Die Abklingquote der Strahlung über dem Gewebe dient als Maß für die Absorption des injizierten Insulins. Dieser Schluß von Geschwindigkeit und Ausmaß der Radioaktivitätsabnahme auf Geschwindigkeit und Ausmaß der Absorption ist aber nur zulässig, wenn folgende drei Bedingungen erfüllt sind: das ^{125}-markierte Insulin muß der gleichen Absorptionskinetik folgen wie natives Hormon, das Insulinmolekül muß unverändert, intakt in die Blutbahn aufgenommen werden und die gemessene Radioaktivität muß proportional zur Menge nicht absorbierten Insulins sein. Selbst wenn die erste Bedingung, deren Erfüllung trotz neu entwickelter, monojodierter Insuline fraglich ist, unberücksichtigt bleibt, ist die zweite Bedingung erwiesenermaßen unerfüllt. Wie für andere Peptidhormone, wie Parathormon und Calcitonin, der Abbau durch proteolytische Enzyme nachgewiesen werden konnte (14), so fanden Berger et al. in einer Studie mit ^{3}H-markierten Insulinen bei Schweinen auch für Insulin eine degradierende Aktivität des subkutanen Gewebes (15). Diese Ergebnisse sind inzwischen mehrfach bestätigt worden (16, 17). Außerdem sprechen die biologisch-metabolischen Effekte des exogen zugeführten Insulins dafür, daß ein nicht

unerheblicher Anteil des subkutan applizierten Insulins abgebaut und/oder inaktiviert wird, noch bevor er in die Blutbahn gelangt. So ist bei intravenöser Infusion, daß heißt unter Umgehung der Einflüsse des Gewebes auf das applizierte Hormon, für den gleichen Stoffwechseleffekt eine geringere Dosis nötig, als bei subkutaner Injektion (18, 19).

Neben dieser Degradation des Insulins konnte eine ungleichmäßige Verteilung des subkutan injizierten Insulins im Unterhautfettgewebe nachgewiesen werden (15). So geht näher an der Oberfläche gelegenes ^{125}J-Insulin bei der Bestimmung der Radioaktivität stärker in die Messung ein, als tiefer lokalisiertes. Gerade letzteres aber wird offenbar früher und schneller absorbiert. Beide Faktoren, sowohl die Degradation als auch die unregelmäßige Verteilung des subkutan injizierten Hormons bleiben bei der Methode nach Binder unberücksichtigt, und es ist daher nicht verwunderlich, daß mit dieser Methode zu geringe Absorptionsraten und zu hohe Halbwertszeiten geschätzt werde: Die ermittelten Absorptionsraten zeigen bis zu 5 bis 6 Stunden einen linearen Verlauf, und die Halbwertszeit des Insulins im Gewebe der Injektion beträgt ca. 170 Minuten (6, 20, 21).
Das bedeutet, daß der 1/2 bis 1 Stunde post injectionem erreichte Abfall der Blutglukose-Zeit-Kurve nach Injektion von Actrapid^{R} in eine Zeitspanne fällt, in der noch bis zu 80% des injizierten Insulins im Gewebe liegen sollen. Damit weist die mit Hilfe der Strahlungsabnahme geschätzte Absorptionsrate eine erhebliche Diskrepanz zu dem biologisch-metabolischen Wirkprofil des Insulins auch in der klinischen Anwendung auf.
Aber nicht nur die Stoffwechseleffekte stellen den Verlauf und die Höhe der so ermittelten Absorp-

tionsraten in Frage. Die Linearität der Absorption steht weiterhin in krassem Widerspruch zu dem exponentiellen Verlauf, der einerseits für ^{131}J ermittelten Clearance-Rate und andererseits auch der für subkutan injizierte Substanzen mathematisch berechneten Absorptionskinetik (22, 23).
Die mathematisch ermittelte Absorptionsrate konnte in ihrem monoexponentiellen Verlauf von Berger et al. im Tierversuch für ^{3}H-markierte Insuline bestätigt werden (15). Sie wurde unter Berücksichtigung der lokalen Insulindegradation im Gewebe erarbeitet und steht in guter zeitlicher und quantitativer Relation zu den Stoffwechseleffekten des subkutan injizierten Insulins.

Weitere Methoden zur Charakterisierung der Absorption subkutan injizierter Insuline bedienen sich der direkten Messung der Insulinkonzentrationen im Blut. Der entscheidende Vorteil der direkten Bestimmung besteht darin, daß lokale Einflüsse im Gewebe insofern berücksichtigt werden, als nur tatsächlich absorbiertes, intaktes Insulin gemessen wird. Eine dieser Methoden beruht auf der Verwendung von semisynthetischem tritiierten Insulin nach Halban und Offord (24). Dieses ^{3}H-Insulin verhält sich wie das native Hormon und die Methode fand bislang schon mehrfach Anwendung (25, 26). Bei diabetischen Patienten, die Im Verlauf einer längeren Substitutionstherapie Antikörper gegen Insulin gebildet haben, ist sie aber, eben auf Grund dieser Antikörper, nicht ohne weiteres anwendbar. Das gilt auch für die im Folgenden beschriebene weitere Methode.
Nach subkutaner Injektion von Insulin werden die

Insulinkonzentrationen im Blut direkt radioimmunologisch gemessen. Bei dieser Methode ist von besonderem Vorteil, daß die kommerziell erhältlichen Alt- sowie Verzögerungsinsuline angewandt und in ihrer Absorptionskinetik näher charakterisiert werden können. Allerdings erfordert sie gesunde Normalpersonen oder Patienten, die keine Antikörper gegen Insulin haben. Die zirkulierenden Insulinspiegel im Serum dienen als Maß für die Menge aus dem Gewebe absorbierten Insulins.
Bei Anwendung dieser Methode stellt sich die Frage, inwieweit die gemessenen Insulinkonzentrationen tatsächlich dem exogen zugeführten, aus dem Gewebe absorbierten Insulin entsprechen oder inwieweit ein Teil der endogenen Insulinsekretion entstammt. Zur Differenzierung der Anteile exogenen und endogenen Insulins dienen die C-Peptid-Spiegel im Serum: schon wenige Minuten nach der Injektion von Altinsulin kommt es zu einem deutlichen Absinkinken der C-Peptid-Konzentrationen (5). Dieser Effekt ist bedingt durch den initialen Blutzuckerabfall, der nach Altinsulin-Applikation auftritt und die Insulinsekretion der ß-Zellen reprimiert. Somit zeigen sinkende C-Peptid-Werte das Sistieren der endogenen Insulinausschüttung an. Das bis zu diesem Moment sezernierte Insulin verschwindet auf Grund der kürzeren Halbwertszeit von vier Minuten (27) schneller aus der Blutbahn als das C-Peptid mit einer Halbwertszeit von 30 bis 40 Minuten (5). Damit entsprechen schon wenige Minuten nach der Injektion von Altinsulin die gemessenen Seruminsulinspiegel weitgehend dem aus dem Gewebe absorbierten Hormon. Die Geschwindigkeit des Insulinanstiegs kann damit als direktes Maß für die Geschwindigkeit der Absorption dienen, und die pharmakokinetischen Parameter IRI_{max}, $T_{IRI_{max}}$, AUC und BV der Insulin-Zeit-Kurven können zur Charakterisierung der Absorp-

tionskinetik des subkutan injizierten Insulins herangezogen werden.
Anders liegen die Verhältnisse nach der Injektion von Verzögerungsinsulinen. Diese Präparate bewirken über ein verzögertes und geringeres Absinken der Glukosekonzentrationen, das erst 2 bis 2 1/2 Stunden post injectionem signifikant wird (Tab. 8) eine weniger starke Reprimierung der Insulinsekretion, so daß der Anteil endogenen Insulins an den gemessenen Seruminsulin-Konzentrationen hoch ist. (vergl. C-Peptid-Spiegel im Serum nach subkutaner Injektion von Verzögerungsinsulinen; C. Hauff, S. Sundermann, in Vorbereitung.)
Dennoch können plötzliche Steigerungen der Seruminsulinspiegel durchaus auf eine Zunahme exogenen, absorbierten Insulins zurückgeführt werden, insbesondere, da in unseren Versuchen diese Steigerung in Phasen mit niedrigen Glukosespiegeln, 2 1/2 Stunden oder mehr nach der Insulinapplikation, aufgetreten sind.

Mit der in der vorliegenden Studie angewandten direkten Methode zur Charakterisierung der Insulinabsorption wurden nur gesunde Personen ohne Insulinantikörper untersucht. Es stellt sich die Frage, inwieweit die erzielten Ergebnisse auch auf diabetische Patienten übertragbar sind. Dabei müssen folgende Phänomene Berücksichtigung finden: Einerseits tritt bei gesunden Personen nach subkutaner Insulininjektion eine Gegenregulation durch kontrainsulinäre Hormone ein (5), so daß mehr oder weniger ausgeprägte Änderungen der Insulinabsorption kaum mit großen Veränderungen der übrigen Stoffwechselparameter, insbesondere der Blutzuckerspiegel, einhergehen. So haben signifikante Steige-

rungen des durch Mixtard^{R}-Applikation bedingten Seruminsulin-Anstiegs unter Fahrradergometerbelastung 2 1/2 Stunden post injectionem ebensowenig wie die Steigerungen des nach Actrapid^{R}-Injektion auftretenden Insulinanstiegs durch die Zugabe von Eigenserum zur Injektion einen Einfluß auf die Blutglukosekonzentrationen (Abb. 6, untere Graphik; Tab. 2). Lediglich so massive Änderungen, wie sie durch die Massage der Injektionsstelle nach Injektion sowohl von Mixtard^{R} als auch von Monotard^{R} oder durch Trasylol^{R}-Zugabe zur Applikation von Actrapid^{R} hervorgerufen werden, bewirken eine signifikante Erniedrigung der Glukosespiegel im Vergleich zu den Spiegeln nach Mixtard^{R}-, Monotard^{R}- oder Actrapid^{R}-Injektion ohne Massage beziehungsweise ohne Trasylol^{R}-Zugabe (Abb. 5, untere Graphik; Abb. 6, untere Graphik; Abb. 1, untere Graphik).

Bei diabetischen Patienten, insbesondere bei Hyperglykämien oder postprandial, ist dagegen damit zu rechnen, daß Änderungen der Insulinabsorption und damit der zirkulierenden Insulinspiegel starke Auswirkungen auf die übrigen Stoffwechselparameter haben dürften.

Andererseits ist es möglich, daß die Absorptionsvorgänge in der Subkutis durch die bei Diabetikern auftretenden Alterationen des Kapillarsystems Abweichungen von dem Absorptionsablauf bei Gesunden zeigen. Auch die bei Diabetikern immer wieder auftretenden großen intra- und interindividuellen Variationen in der Insulinabsorption unter subkutaner Substitutionstherapie wurden unter anderem auf diese Gefäßveränderungen zurückgeführt. Die in dieser Studie an Gesunden gezeigte gute Reproduzierbarkeit und die geringen Abweichungen der Absorption bei standardisierten Insulininjektionen (Abb. 1, SEM betragen nach

Actrapid^{R}-Injektion (für n=8) 9,9 ± 0,6; Abb. 3, nach Monotard^{R}-Injektion (für n=24) 6,5 ± 0,4, nach Mixtard^{R}-Injektion (für n=20) 5,6 ± 0,5 und nach NPH-Leo^{R}-Injektion (für n=24) 9,1 ± 0,8 % der jeweiligen Mittelwerte, der Seruminsulinkonzentrationen unter Kontrollbedingungen.) legen aber den Schluß nahe, daß diese Variationen zu einem großen Teil auf exogenen Einflüssen, wie auch den hier dargestellten, beruhen.

Die vorliegende Untersuchung wurde in Erweiterung einer früheren Studie zur Wirkung der Proteaseninhibitors Aprotinin als Trasylol^{R} auf die Absorption subkutan injizierten Altinsulins (28) gemacht. Sie zeigt, daß die Absorption von Actrapid^{R} pharmakologisch zu beeinflussen ist. Von den untersuchten Substanzen hat die Zugabe von Protamin-Lösung zur Injektion keinen beschleunigenden Effekt, sondern wirkt verzögernd auf den Übergang des Hormons in die Blutbahn. Diese Wirkung beruht wahrscheinlich auf einer Komplexbildung zwischen den Proteinen Protamin und Insulin, ähnlich den NPH-Insulin-Präparationen (Tab. 2).
Nach subkutaner Altinsulin-Injektion kommt es zu einer Steigerung der Seruminsulinspiegel. Dieser Insulinanstieg kann durch die Zugabe von Trasylol^{R} zum injizierten Insulin signifikant beschleunigt und verstärkt werden (Abb. 1). Da die sinkenden Blutzuckerspiegel die endogene Insulinsekretion reprimieren (5), und da Trasylol^{R} selbst keine Wirkung auf die C-Peptid-Konzentrationen hat, die endogene Insulinsekretion also unbeeinflußt läßt (28), ist auszuschließen, daß die höheren Insulinkonzentrationen auf einer Vergrößerung des endogenen Anteils beruhen.
Gesteigert ist der exogene Insulinanteil, auf Grund einer gesteigerten Absorption aus der Subkutis.

Diese Absorptionssteigerung ist weder der Volumenvergrößerung zuzuschreiben, da die Vergleichsinjektion mit physiologischer Kochsalzlösung auf ein gleiches Volumen aufgefüllt wurde, noch auf mögliche Aktivitäten des Lösungsmittels des Trasylol^{R}, einer Benzyl-Alkohol-Lösung, die keinerlei absorptionsfördernde Wirkung auf das subkutan injizierte Insulin hat (Tab, 2), zurückzuführen.
Der Proteaseninhibitor Aprotinin, die Wirksubstanz im Trasylol^{R}, selbst verbessert also die Absorption des Insulins aus dem subkutanen Depot. Dabei ist noch nicht eindeutig geklärt, auf welchem molekularen Mechanismus dieser Effekt beruht. Jedoch führen verschiedenste Untersuchungen zu der Annahme, daß die lokale Insulindegradation im Gewebe durch Trasylol^{R} gehemmt wird (15, 28, 29), und so ein größerer Teil des injizierten Insulins in die Blutbahn gelangen kann. Für diese Vermutung spricht weiterhin, daß Trasylol^{R} bei Patienten mit einer spezifischen Resistenz gegen subkutan injiziertes Insulin, die auf exzessiver Degradation des Hormons in der Subkutis beruht, erfolgreich zur Therapie angewandt werden konnte: mit Hilfe von Insulingaben mit Trasylol^{R} wurde die Stoffwechsellage wesentlich verbessert und die benötigte Insulindosis gesenkt (30, 31, 32, 33).

Nicht nur Trasylol^{R} hat einen nachweislich beschleunigenden Effekt auf die Absorption subkutan injizierter Insuline. Untersuchungen zur Wirkung verschiedener Eiweißmoleküle auf die Absorption führen zu der Vermutung, daß Proteinsubstanzen als Carrier für die Insulinmoleküle wirken und so bei gleichzeitiger Injektion mit dem Insulin eine verbesserte Aufnahme in die Blutbahn bewirken. Bertram fand im Jahre 1929, daß der Blutzuckerabfall nach

subkutaner und intramuskulärer Insulinapplikation durch Zugabe verschiedener Proteinsubstanzen zur Injektion eine wesentliche Verstärkung erfährt. Der stärkste Blutzuckerabfall wird durch Zugabe von Eigenserum erzielt, wobei die Globuline einen größeren Effekt haben als Albumin (34). In der Tat bewirkt die Zugabe von Eigenserum zur subkutanen Insulininjektion eine signifikante Steigerung der Absorption (Abb. 2). Die Frage nach dem molekularen Mechanismus der Effekte sowohl von Trasylol^{R} als auch von Eigenserum bedarf der weiteren Abklärung.

Die meisten Diabetiker werden mit Verzögerungsinsulinen behandelt und die Absorptionskinetik dieser Präparate ist deshalb von besonderem klinischen Interesse.
Nach der subkutanen Injektion von Monotard^{R}-Insulin oder von NPH-Leo^{R}-Insulin zeigen die Insulin-Zeit-Kurven in ihrem Verlauf keine signifikanten Unterschiede. Die Applikation einer gleichen Dosis Mixtard^{R}-Insulin dagegen bewirkt einen statistisch gesichert stärkeren und schnelleren Anstieg der Insulinkonzentrationen (Abb. 3), der mit einem erheblichen Absinken der Blutzuckerwerte einhergeht (Tab. 8). Ursächlich dafür ist die Alt-Insulin-Komponente des Mixtard^{R} - Mixtard^{R} besteht zu 30% aus Alt- und zu 70% aus NPH-Insulin. Die Effekte der Mixtard^{R}-Applikation lassen keine reinen Effekte des Alt- oder reinen Effekte des NPH-Anteils erkennen und es wird deutlich, daß eine Wechselwirkung zwischen beiden Anteilen besteht, so daß sie sich in ihrer Reaktion beeinflussen.
Nicht nur subkutan injiziertes Altinsulin, sondern auch die Verzögerungsinsuline sind in ihrer Absorption ganz erheblichen Alterationen durch exogene

Einflüsse unterworfen.
Von diesen Einflüssen ist die Wärme von besonderer klinischer Relevanz, da sie z. B. als sehr warmes Bad im täglichen Leben eines Diabetikers vorkommt. Die Absorption von subkutan injizierten Altinsulinen zeigt ausgeprägte Reaktionen auf Temperaturänderungen: ein warmes Bad bewirkt eine Steigerung und ein kaltes Bad eine Verminderung der Absorption (5, 42). Die Durchblutung spielt eine entscheidende Rolle für die Absorption einer Substanz aus dem Gewebe: sowohl mit wachsender Durchblutungsrate als auch mit größerer Kapillarisierung des Gewebes nimmt die Absorption subkutan injizierten Insulins zu (35). Da eine Anhebung der Hauttemperatur eine Hyperämisierung mit der Öffnung funktioneller Kapillaren bewirkt, beruht die Steigerung der Absorption von injiziertem Insulin möglicherweise auf einer Verbesserung der Hautdurchblutung durch die lokale Wärme. Für die Effekte eines Saunabades wurden gegenteilige Ergebnisse gefunden, wahrscheinlich bedingt durch methodische Unterschiede (36, 37).
2 1/2 Stunden nach der Injektion hat das 30minütige Auflegen einer 40°C warmen Wärmflasche keine fördernde Wirkung auf die Absorption von Verzögerungsinsulinen: weder NPH-Leo^{R}, noch Monotard^{R}, noch Mixtard^{R} werden signifikant in ihrer Absorption beeinflußt (Tab. 6). Daß heißt, während die Altinsulin-Absorption ausgeprägte Änderungen nach Wärmeanwendung zeigt, bleibt die Absorption der untersuchten Verzögerungsinsuline unbeeinflußt.

Schon Lawrence (38), Bürger und Kramer (39) berichteten von einer Verstärkung der Insulinwirkung durch Muskelarbeit und auch heute darf die Gefahr einer durch körperliche Betätigung induzierten Hypoglykämie bei insulinbehandelten Dia-

betikern nicht außer Acht gelassen werden. Auf der Suche nach den Ursachen dieser Arbeitshypoglykämien stellt sich die Frage, ob die Muskelarbeit über eine Steigerung der Insulinabsorption zu höheren Seruminsulinspiegeln führt. Verschiedene Studien beschäftigen sich mit den Einflüssen von körperlicher Belastung auf die Absorption subkutan injizierten Insulins (5, 7, 12, 20, 25, 26, 40).
Muskelarbeit direkt nach der subkutanen Altinsulin-Applikation bewirkt eine massive Absorptionssteigerung (25, 26, 40), wobei Beinarbeit sofort nach der Injektion die Absorption in den Oberschenkel injizierten Hormons zu beschleunigen scheint als die Absorption aus Arm- oder Bauchregionen (20). Auf Grund dieser Ergebnisse wurde zur Vermeidung von Hypoglykämien ein Wechsel der Injektionsstelle in Hautareale über nicht arbeitende Muskulatur empfohlen (20). Da weitere Untersuchungen zeigen, daß Muskelarbeit, die erst 30 Minuten nach der Insulininjektion, daß heißt zu einer Zeit nach der Insulingabe, zu der sie auch im täglichen Leben eines Diabetikers wahrscheinlich ist, keinen Einfluß auf die Absorption des Hormons aus dem subkutanen Depot hat (5, 7, 12), ist diese Maßnahme wenig sinnvoll.
Dem für Altinsulin gültigen Sachverhalt ähnlich sind die Verhältnisse nach subkutaner Applikation von Verzögerungsinsulinen: die Seruminsulinkonzentrationen steigen durch 30minütige Fahrradergometerbelastung 2 1/2 Stunden nach der Injektion von Mixtard^{R} gegen Ende der Muskelarbeit für die Dauer von 10 Minuten signifikant über die in Ruhe gewonnenen Kontrollwerte (Abb. 6, obere Graphik) an. Dennoch kommt es bei den untersuchten gesunden Probanden nicht zu einer Verstärkung des Glukoseabfalls (Abb. 6, untere Graphik).
Nach Applikation von Monotard^{R} bzw. NPH-Leo^{R} bewirkt

die Fahrradergometerbelastung weder eine Änderung der Insulinabsorption noch der Blutglukosekonzentrationen im Vergleich zu den Kontrollen (Abb. 4, Abb. 5, jeweils obere und untere Graphik).
Die bei insulinbehandelten Diabetikern unter körperlicher Belastung auftretenden Hypoglykämien sind somit in der überwiegenden Zahl der Fälle nicht Folge einer gesteigerten Absorption, sondern wahrscheinlich Folge des bei Muskelarbeit vermehrten Kohlehydrat- und verminderten Insulinbedarfs bei gleichzeitiger iatrogener Hyperinsulinämie. Daher können geeignete Gegenmaßnahmen nicht die Absorption betreffen, sondern müssen symptomatisch in vermehrter Kohlehydrataufnahme und kausal in Reduktion der applizierten Insulindoses bestehen. Im Einklang dazu stehen Untersuchungsergebnisse, die zeigen, daß bei diabetischen Patienten unter 3stündiger Fahrradergometerbelastung zur Vermeidung einer Hypoglykämie eine Reduktion der längerwirkenden Insuline auf 20% der normalerweise benötigten Dosis und ein Weglassen der gesamten Altinsulin-Dosis nötig sind (5).

Eine 30minütige lokale Massage der Injektionsstelle bewirkt bei allen untersuchten Verzögerungsinsulinen eine Steigerung der Absorption aus dem subkutanen Gewebe, die schnell einsetzt und über das Ende der Massage hinaus andauert (Abb. 5, Abb. 6, Abb.7, jeweils obere Graphik). Der gleiche absorptionsfördernde Effekt der Massage zeigt sich auch nach subkutaner Altinsulin-Injektion (5). Die durch die Massage bedingte lokale Hyperämisierung ist allein zur Erklärung dieser Wirkung nicht ausreichend. Wird doch die Absorption durch die Durchblutungssteigerung durch die Wärmflasche nicht signifikant beeinflußt. Möglicherweise bewirkt die Massage eine mechanische Verteilung des Insulins im subkutanen De-

pot und damit einhergehend eine Vergrößerung der absorbierenden Oberfläche. Die Absorptionssteigerung von subkutan injizierten Verzögerungsinsulinen durch die Massage ist von klinischer Bedeutung: möglicherweise kann sie therapeutisch genutzt werden, indem versucht wird, Blutzuckerspitzen nach Mahlzeiten durch Massage der Injektionsstelle und die dadurch bedingte Absorptionssteigerung auch längere Zeit nach der Applikation von Verzögerungsinsulinen noch abzufangen. So zeigen vorläufige Untersuchungen bei 17 diabetischen Patienten durch Massage der Injektionsstelle vor und nach den Mahlzeiten über einen Zeitraum von 3 bis 5 Monaten eine Verbesserung der Blutzuckerkontrolle - deutlich an dem Absinken sowohl der HbA_1-Spiegel als auch der Glukosurie (41).

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die Absorption subkutan injizierten Altinsulins durch Zugabe von Trasylol^R zur Injektionslösung erheblich gesteigert werden kann, wobei dieser Effekt schon therapeutische Anwendung fand, und daß die Absorption subkutan injizierter Verzögerungsinsuline durch Massage der Injektionsstelle gesteigert werden kann. Dabei ist besonders beachtlich, daß dieser Effekt noch 2 1/2 Stunden post injectionem hervorgerufen werden kann. Das Ausmaß der Wirkung ist abhängig von der Zusammensetzung des injizierten längerwirkenden Insulinpräparates.

F Z U S A M M E N F A S S U N G

Die vorliegende Studie dient der näheren Charakterisierung der Absorptionskinetik von Alt- und Verzögerungsinsulinen. 24 gesunden, normalgewichtigen Männern im Alter von 25 ± 4 Jahren wurden nach 10stündiger Nahrungskarenz subkutane Insulininjektionen in den Oberschenkel verabreicht. Die im Anschluß daran gemessenen Seruminsulin-Konzentrationen dienen als Maß für die Absorption des Hormons aus dem Unterhautfettgewebe.
8 Versuchspersonen erhielten an 5 aufeinanderfolgenden Tagen subkutane Injektionen von 10 I.E. Actrapid^{R}. Dabei wurden in randomisierter Reihenfolge entweder 0,5ml NaCl-Lösung, 0,5ml Trasylol^{R}, 0,5ml Eigenserum, 0,5ml Benzyl-Alkohol-Lösung - dem Lösungsmittel des Aprotinin im Trasylol^{R} - oder 0,5ml Protamin-Lösung zur Injektionslösung gegeben. Protaminzugabe zur Injektion bewirkt eine Verzögerung der Insulinabsorption im Vergleich zu den Kontrollversuchen mit NaCl-Zusatz. Serum dagegen ruft eine Steigerung und Beschleunigung der Absorption hervor, ebenso Trasylol^{R}, während das Lösungsmittel im Trasylol^{R}, die Benzyl-Alkohol-Lösung, allein die Absorption unbeeinflußt läßt. Der Effekt des Proteaseninhibitors Trasylol^{R} beruht möglicherweise auf der Inhibition der lokalen Insulindegradation im Gewebe, und er fand schon erfolgreich therapeutische Anwendung bei Patienten mit einer spezifischen, auf exzessivem Insulinabbau in der Subkutis beruhender Insulinresistenz.
Zur Charakterisierung der Absorptionskinetik der längerwirkenden Insuline erhielten je 6 Versuchspersonen subkutane Injektionen von 20 I.E. NPH-

Leo^{R}, Monotard^{R} oder Mixtard^{R}. Während für die Kontrollversuche die gesamte Beobachtungszeit von 250 Minuten in Ruhe verbracht wurde, erfolgte bei den übrigen Versuchen 2 1/2 Stunden post injectionem für die Dauer von 30 Minuten entweder Massage der Injektionsstelle, Auflegen einer 40°C warmen Wärmflasche oder Muskelarbeit in Form von Fahrradergometerbelastung bei einem Puls von 115 ± 5 Schlägen pro Minute und einer Leistung von ca. 100 Watt. Nach Injektion von NPH-Leo^{R} und Monotard^{R} kommt es zu einem Anstieg der Seruminsulinspiegel, ohne daß Unterschiede zwischen den beiden Präparaten vorliegen. Nach Injektion von Mixtard^{R} steigen die Insulinspiegel ebenfalls an. Auf Grund des Altinsulinanteils des Mixtard^{R} ist der Anstieg aber 60 Minuten früher signifikant und die erreichten Konzentrationen sind statistisch gesichert höher als nach Monotard^{R} bzw. NPH-Leo^{R}-Applikation.

Die lokale Wärmeanwendung hat keinen Einfluß auf die Insulinabsorption und die Beinarbeit bewirkt lediglich nach der Applikation von Mixtard^{R} eine Beschleunigung des Insulinübergangs in die Blutbahn. Im Gegensatz dazu wird durch die Massage der Injektionsstelle nach Applikation aller drei untersuchten Präparate eine massive Steigerung der Insulinabsorption hervorgerufen, deren Ausmaß von der Zusammensetzung der Insulinpräparate abhängig ist. Bemerkenswert ist, daß diese Effekte noch 2 1/2 Stunden post injectionem hervorgerufen werden können.

G L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1 Rollo, J. Cases of Diabetes Mellitus with the Results of the Trials of Certain Acids and other Substances in the Cure of the Lues Venera. 2nd edit. London, 1798.

2 Bouchardat, M. De l'entrainement ou l'exercise forcé appliqué au traitement de la glucosurie. Annuaire de thérapeutic de matière medical pour 1865, pp. 291-336, 1865.

3 Trousseau, A. Clinical Medicine, Lectures delivered at the Hotel Diez, Paris. Vol. II, Philydelphia, p. Blakiston, Son and Co., 1882, Lecture 64, Glucosuria: Saccharine diabetes, pp. 307-31.

4 Banting, F.G. Best, C.H. Pancreatic extracts in the treatment of diabetes mellitus. na. med. Ass. J. 12. 142-44, 1922.

5 Cüppers, H.J. Pharmakokinetik subkutan injizierten Insulins. Habilitationsschrift, Universität Düsseldorf, Medizinische Fakultät, Düsseldorf, 1981.

6 Binder, C. Absorption of injected insulin. Acta Pharmacol. Toxic., Copenhagen 27 (Suppl. 2): 1-87, 1969.

7 Galloway, J.A.
Spradlin, C.T.
Nelson, R.L.
Wentworth, S.M.
Davidson, J.A.
Swarner, J.L.

Factors influencing the absorption, serum insulin concentration, and blood glucose responses after injections of regular insulin and various insulin mixtures.
Diabetes Care 4: 366-76, 1981.

8 Cahill, G.F.
Etzwiler, D.D.
Freinkel, N.

"Control" and diabetes.
New Eng. J. Med., 294: 1004, 1976.

9 Brownlee, M.
Cahill, G.F.

Diabetic control and vascular complications.
Atherosclerotic Reviews 4: 29-70, 1979.

10 Stainer, A.
Sura, J.

The determination of nonesterified fatty acids in blood serum using stable cupric reagent.
J. Clin. Chem. Biochem. 15: 513-14, 1977.

11 Berger, M
Berchtold, P.
Cüppers, H.J.
Drost, H.
Kley, H.K.
Müller, W.A.
Wiegelmann, W.
Zimmermann, H.
Teschow, H.
Gries, F.A.
Krüskemper, H.L.

Metabolic and hormonal effects of muscular exercise in juvenile type diabetics.
Diabetologia 13: 255-65, 1977.

12 Kemmer, F.A.
Berchtold, P.
Berger, M.
Cüppers, H.J.

Exercise-induced fall of blood glucose unrelated to alteration of insulin mobilisation.
Diabetes 28: 1131-37, 1980.

Starke, A.
Gries, F.A.
Zimmermann, H.

13 Klotz, V. Klinische Pharmakokinetik. Stuttgart, New York, G. Fischer Verlag, 1979.

14 Parsons, J.A.
Rafferty, B.
Stevenson, R.W.
Zanelle, J.M. Evidence that protease inhibitors reduce the degradation of parathyroid hormone and calcitonin injected subcutaneously. Br. J. Pharmac.: 66 25 32, 1979.

15 Berger, M.
Halban, P.A.
Girardier, L.
Seydous, J.
Offord, R.E.
Renold, A.E. Absorption kinetics of subcutaneously injected insulin. Evidence for degradation at the injection site. Diabetologia 17: 97-99, 1979.

16 Stevenson, R.W.
Tsokak, T.J.
Parsons, J.A. Matched glucose responses to insulin administered subcutaneously and intravenously. Evidence for subcutaneous inactivation. Diabetologia, 18: 23-426, 1980.

17 Lancet-Editorial Subcutaneous injections and absorpsorption of insulin. Lancet, I: 1005-1006, 1980.

18 Dandona, P.
Foster, M.
Healey, F.
Greenbury, E.
Beckett, A.G. Low-dose insulin infusions in diabetic patients with high insulin requirements. Lancet 2: 283-85, 1978.

19 Katsilambros, N.
Verykokidou, H.
Philipides, P.
Moiras, G.
Daikos, G.K.
Comparison of intravenous and subcutaneous insulin infusions in man.
Lancet 1: 609-10, 1979.

20 Koivisto, V.A.
Felig, P.
Effects of leg exercise on insulin absorption in diabetic patients.
N. Eng. J. Med. 298: 79-83, 1978.

21 Koivisto, V.A.
Felig, P.
Alterations in insulin absorption and in blood glucose control associated with varying insulin injection sites in diabetic patients.
Ann. Intern. Med. 92: 59-61, 1980.

22 Teorell, T.
Kinetics of distribution of substances administered to the body.
Arch. Int. Pharmacodyn. 37: 209-25, 1957.

23 Schou, J.
Absorption of drugs from subcutaneous connective tissue.
Pharmacol. Rev. 13: 441-64, 1961.

24 Halban, P.A.
Offord, R.E.
The preparation of a semisynthetic tritiated insulin with a specific radioactivity of up to 20 Curies per millimole.
Biochem. J. 151: 219-225, 1975.

25 Berger, M.
Halban, P.A.
Müller, W.A.
Offord, R.E.
Renold, A.E.
Vranic, M.
Mobilization af subcutaneously injected tritiated insulin in rats: effects of muscular exercise.
Diabetologia 15; 133-40, 1978.

26 Berger, M.
Halban, P.A.
Müller, W.A.
Offord, R.E.
Vranic, M.
Renold, A.E.
Pharmacocinetics of subcutaneously injected tritiated insulin: effect of muscular exercise.
Diabetes 28 (suppl. 1); 52-57, 1979.

27 Halban, P.A.
Berger, M.
Offord, R.E.
Distribution and metabolism of intravenously injected tritiated insulin in rats.
Metab. 28: 1097-1104, 1979.

28 Berger, M
Cüppers, H.J.
Halban, P.A,
Offord, R.E.
The effect of aprotinin on the absorption of subcutaneously injected regular insulin in normal subjects.
Diabetes 29: 81-83, 1980.

29 Offord, R.E.
Philippe, J.
Davis, J.G.
Halban. P.A.
Berger, M.
Inhibition of degradation of insulin by ophthalmic acid and by a bovine pancreatic protease inhibitor.
Biochem. J. 182: 249-251, 1979.

30 Gunnarson, R.
Arner, P.
Heding, L.
Linde, B.
Ostman, J.
Aprotinin reduces insulin resistance caused by excessive degradation in subcutaneous tissue.
Diabetologia 19: 279, 1980.

31 Paulsen, E.P.
Courtney, J.W.
Duckworth, W.C.
Insulin resistance caused by massive degradation of subcutaneous insulin.
Diabetes 28: 640-645, 1979.

32 Müller, W.A.
Taillens, C.
Léreret, C.
Berger, M.
Resistance against subcutaneous insulin successfully managed with aprotinin.
Lancet, I: 1245-1246, 1980.

Philippe, J.
Halban, P.A.
Offord, R.E.

33 Freidenberg, G.R.
White, S.
Cataland, S.
O'Dorist, T.
Sotos, J.
Santiago, J.
Diabetes responsive to intravenous but not subcutaneous insulin: effectiveness of Aprotinin.
N. Engl. J. Med. 305: 363-8, 1981.

34 Bertram, F.
Über die Aktivierung des Insulins durch Eiweißkörper.
Klin. Wschr. 4: 2285-2288, 1925.

35 Kolendorf, K.
Boysen, J.
Nielson, S.L.
Adipose tissue blood flow and insulin disappearance from subcutaneous tissue.
Clin. Pharmac. Ther. 25: 589-604, 1979.

36 Koivisto, V.A.
Sauna-induced acceleration of insulin absorption from subcutaneous injection site.
Brit. Med. J. 1: 1413, 1980.

37 Cüppers, H.J.
Berchtold, P.
Berger, M.
Sauna-induced acceleration of insulin absorption.
Letter, Brit. Med. J. 2: 307, 1980.

38 Lawrence, R.D.
The effect of exercise on insulin action in diabetes.
Brit. Med. J. I: 648-652, 1926.

39 Bürger, M.
Kramer, H.
Über die durch Muskelarbeit hervorgerufene Steigerung der Insulinwirkung auf den Blutzuckergehalt beim normalen und gestörten Kohlehydratstoffwechsel

und ihre praktische und theoretische Bedeutung.
Klin. Wschr. 7: 745-750, 1928.

40 Vranic, M.
Berger, M.
Diabetes and exercise.
Diabetes 28: 147-67, 1979.

41 Dillon, R.S.
Improvement of glycohemoglobin (HbA_1) levels following massage of insulin injection sites at mealtimes.
Diabetes 28, (Suppl. I), 345, 1979.

42 Berchtold, P.
Cüppers, H.J.
Jörgens, V.
Berger, M.
Effects of different temperatures and local massage on the absorption of subcutaneously injected insulin.
Diabetes 29, (Suppl. 2), 71 A, 1980.

H DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. M. Berger danke ich für die Überlassung des Themas und die freundlich Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Weiterhin gilt mein Dank Herrn Priv. Doz. H.J. Cüppers für die wissenschaftliche Anleitung, Frau C. Broermann für die technische Beratung und Unterstützung sowie Frau M. Schütte.

Denjenigen meiner Freunde, die sich als kooperative Probanden zur Verfügung gestellt haben, möchte ich ebenfalls danken.

Schließlich möchte ich mich für die großzügige Unterstützung der Firmen Bayer-AG, Leverkusen, Nordisk-Hormon-Chemie, München und Novo Industrie GmbH, Mainz bedanken.

Anlage 1

Heidi Hegner
Dorfstr. 19 a
4224 Hünxe-II

Hünxe-Krudenburg, 11.01.1982

L E B E N S L A U F

Persönliche Daten

Name:	Heidi Hegner
Adresse:	Dorfstr. 19 a, Hünxe-II
Geburtsdatum:	19.04.1958
Geburtsort:	Dinslaken
Konfession:	evangl.
Familienstand:	ledig
Staatsangehörigkeit:	deutsch

1964	Einschulung in die Grundschule, Dorfschule Dinslaken-Hiesfeld
1967	Wechsel zum Ernst-Barlach-Gymnasium Dinslaken
1976	Reifeprüfung des mathematisch-naturwissenschaftlichen Gymnasiums
1976	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Universität Düsseldorf
1978	Ablegen der Ärztlichen Vorprüfung
1979	Ablegen des Ersten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung
1982	voraussichtlich Ablegen des Zweiten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung
1983	voraussichtlich Ablegen des Dritten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung.

Heidi Hegner

Anlage 2

Heidi Hegner
Dorfstr. 19 a
4224 Hünxe-II

Hünxe-Krudenburg, 11.01.1982

E R K L Ä R U N G E N

An die
Medizinische Fakultät der Universität Düsseldorf

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß

- ich die vorgelegte Dissertation ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe;
- die vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt wurde;
- ich erstmals die Zulassung zur Promotion beantrage.

Die Promotionsordnung ist mir bekannt.

Heidi Hegner

FOTODRUCK J. MAINZ – Telefon: (02 41) 2 73 05
Neupforte 13, Nähe Markt, 5100 Aachen